

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-95576

(P2001-95576A)

(43) 公開日 平成13年4月10日 (2001.4.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/04		1/68	A 4 B 0 6 3
1/68		C 1 2 R 1:19)	
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 R 1:19)	
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-273560

(22) 出願日 平成11年9月28日 (1999.9.28)

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者

大橋 鉄雄

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社

島津製作所内

(74) 代理人

100097892

弁理士 西岡 義明

F ターム (参考) 4B024 AA13 GA19 HA14

4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ03

QQ06 QQ16 QQ43 QQ58 QR08

QR32 QR62 QS02 QS12 QS25

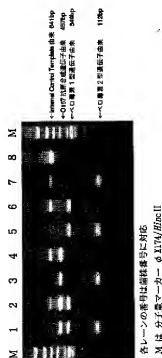
QX05

## (54) 【発明の名称】 腸管出血性大腸菌の検出法

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、食中毒・下痢症にかかる検査における、簡便、迅速な大腸菌 O157 及び腸管出血性大腸菌の検査法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、大腸菌 O157 及びベロ毒素 1 型若しくは 2 型産生性大腸菌を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチド、または、O157 糖合成領域遺伝子及びベロ毒素 1 型 (VT1) 若しくは 2 型 (VT2) 遺伝子、若しくはベロ毒素 2 型の変異型 (VT2vha、VT2vhb、VT2vp1、および VT2vp2) の各遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチドの配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドの混合物を用いることにより、各標的遺伝子毎に異なったサイズの増幅断片を同一反応液内で生成させ、1 型ベロ毒素及び 2 型毒素若しくはその変異型毒素産生菌、さらには O157 抗原保有菌をそれぞれ個別にかつ同時に検出することと特徴としている。



各レーンの番号は菌株番号に対応

M は 分子マーカー

φ 1174/Hec II

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ペロ（志賀）毒素1型遺伝子を保有する大腸菌又はペロ（志賀）毒素2型（その変異型を含む）遺伝子を保有する大腸菌又はO157融合領域遺伝子を保有する大腸菌を選択的に検出するためにそれら遺伝子のヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成された配列番号1、2、3、4、5、6から成るオリゴヌクレオチドの混合物。

【請求項2】請求項1記載のオリゴヌクレオチドの配列のうち少なくとも連続した10塩基以上の同一配列を含むオリゴヌクレオチドの混合物。

【請求項3】請求項1または請求項2の配列を含むオリゴヌクレオチドのうち、少なくとも2種をプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させることを特徴とする方法であって、

(1) 検体中の1本鎖状態の標的ヌクレオチド配列にプライマーをハイブリダイズさせ、4種のヌクレオチドの重合反応により鎖長反応を行わせ、

(2) 得られた2本鎖の標的ヌクレオチド配列を1本鎖に分離した場合、その相補鎖は他方のプライマーによる鎖長反応の鋳型として機能し、

(3) これら2種のプライマーによるハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、特定のヌクレオチド配列が増幅され、増幅したヌクレオチド断片を検出し、

(4) その結果、前記検体中に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することでペロ（志賀）毒素1型遺伝子を保有する大腸菌又はペロ（志賀）毒素2型（その変異型を含む）遺伝子を保有する大腸菌又はO157抗原遺伝子を保有する大腸菌を同時に検出することを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床検査、食品の品質検査、とりわけ食中毒に関する検査、もしくは下痢症検査における大腸菌O157、ペロ毒素産生性大腸菌の検出・同定に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】腸管出血性大腸菌症の起因菌であるペロ（志賀）毒素産生性大腸菌（EHEC又はVTEC）はペロ（又は志賀）毒素産生により出血性大腸炎や、重篤な疾患である溶血性尿毒症候群（hemolytic uremic syndrome）を惹起させることが知られており、臨床検査\*

配列番号1；

(5')d-GTATTTGGACAGCATGGGAGC-(3')... (a)

配列番号2；

(5')d-ACTAATGACACGATTCGTTCC-(3')... (b)

配列番号3；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3')... (c)

配列番号4；

(5')d-CCCCCTCAACTGCTAATA-(3')... (d)

\*では、本菌の検出が重要視されつつある。さらに、O157抗原を保有するいわゆる大腸菌O157は指定伝染病原菌として行政機関への届出が義務づけられている。これら大腸菌の検出および同定には生化学的、免疫化学的な手法が用いられているが、操作が煩雑で結果を得るまでに2日ないし3日程度の時間を要する上、特異性も十分なものではない。

【0003】一方、近年ではオリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能させる遺伝子増幅技術が用いられ、ペロ毒素遺伝子または大腸菌O157に特異的なO157融合領域遺伝子等を標的とした特異性の高い検出が可能となっているが、一つの標的遺伝子ごとに一つの反応液を調製して行っているため、腸管出血性大腸菌の検出のように一つの菌を同定するために複数の標的遺伝子を検出しなければならない場合には複数の反応液を調製しなければならず操作が煩雑である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、オリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能させる遺伝子増幅技術により、EHECの病原因子遺伝子であるペロ（又は志賀）毒素1型遺伝子（VT-1）又はペロ（又は志賀）毒素2型遺伝子（VT-2）若しくはその変異型遺伝子（VT-2vha, VT-2vhh, VT-2vp1, VT-2vp2）又は大腸菌O157の融合領域遺伝子のうち少なくとも一つの遺伝子を保有する大腸菌を一反応で個別に検出するものである。それにより、大腸菌O157を含む腸管出血性大腸菌の簡便、迅速な検査法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、ペロ毒素1型遺伝子（VT-1）検出用プライマー、およびペロ毒素2型（VT-2）遺伝子、若しくはペロ毒素2型の変異型遺伝子（VT-2vha, VT-2vhh, VT-2vp1, VT-2vp2）検出用プライマーおよびO157融合領域遺伝子検出用プライマーの混合溶液を用いて遺伝子増幅法により複数の標的遺伝子を同時に検出するものである。すなわち、本発明は大腸菌O157及び腸管出血性大腸菌の検査において確認しなければならないペロ毒素産生性及び毒素型別、O157であるか否かの血清型型別を一回の検査で行うことを特徴としている。

【0006】ここでいうプライマーとは、次の配列番号1～6

配列番号5:

(5')d-ATCAGTCGTCACCTCACTGGT-(3')・・(e)

配列番号6:

(5')d-CTGCTGTCAACAGTGACAAA-(3')・・(f)

の各配列の一部あるいは全部を有するオリゴヌクレオチドであり、プライマー混合溶液とは配列番号1から6の配列の一部あるいは全部と有するオリゴヌクレオチドのうち、少なくとも2種類以上のオリゴヌクレオチドを含む溶液である。また、各配列の一部とは、少なくとも2連続した10塩基以上の同一配列を含む場合をいう。

【0007】なお、配列番号1及び2はO157糖合成領域遺伝子の塩基配列 (Shinizu, T., et al.: Analysis of the genes responsible for the O antigen synthesis in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Microb. Pathog., 26, 235-247 (1999)) を、配列番号3及び4はペロ毒素1型遺伝子の塩基配列 (Takao, T., et al.: Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin, Microb. Pathog., 5, 357-369 (1988)) を、配列番号5及び6はペロ毒素2型遺伝子の塩基配列 (Jacion, M.P., et al.: Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933, FEMS Microb. Lett., 44, 109-114 (1987); It o, H., et al.: Cloning and nucleotide sequencing of f Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from patient with the hemolytic uremic syndrome, Microb. Pathog., 8, 47-60 (1990); Weinstein, D.L., et al.: Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine, J. Bacteriol., 170, 4223-4230 (1988)) に相補的な配列となっている。

【0008】なお、配列番号1及び2のプライマーセットは457塩基対の当該遺伝子由来の増幅産物が生成するように設計した。また、配列番号3及び4のプライマーセットは349塩基対の増幅産物が生成するように設計した。さらに、配列番号5及び6のプライマーセットは112塩基対の増幅産物が生成するように設計した。

【0009】以上により、アガロースゲル電気泳動等では各プライマーセットによる増幅産物がそれぞれ分離したバンドとして検出されそれら増幅産物の分子量を測定することで各標的遺伝子の同時検出が可能となる。

【0010】遺伝子増幅は、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Science 230, 1350(1985))をもとに行っている。この方法は、ある特定のヌクレオチド配列領域(本発明の場合は、EHECまたはVTECのペロ毒素1型又は2型遺伝子若しくはその変異型遺伝子又はO157抗原合成遺

伝子)を検出する場合、その領域の両端の一方は+鎖を、他方は-鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により1本鎖状態にした試料核酸に対し、鋳型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した2本鎖核酸を再び1本鎖に分離し、再び同様な反応を起こさせる。この一連の操作を繰り返すことで、2つのプライマーに挟まれた領域は検出できるまでにコピー数が増大してくる。さらに、同一反応液内において複数のプライマーセットを互いに干渉しない条件で混在させることにより、複数の遺伝子領域を同時に増幅させることも可能である。

【0011】検体としては、臨床検査材料、例えば、糞便、尿、血液、組織ホモジネートなど、また、食品材料でもよい。これら材料をPCRの試料としてもちいるには、材料中に存在する菌体から核酸成分を分離させる操作が前処理として必要となる。しかし、プライマーがハイブリダイズできる核酸が数分子から数十分子以上存在すればPCRは進むので、検査材料を溶菌酵素、界面活性剤、有機溶媒、酸又はアルカリ等での化学処理、または90℃から100℃での熱処理を行うことでPCRを進行させるに十分な核酸量を持った試料液が調製できる。さらには標的菌が十分存在する場合は核酸抽出処理を省略し、標的菌を含む検体を直接反応液に添加するだけで検出できる場合もある。

【0012】鋳型依存性ヌクレオチド重合反応には、耐熱性DNAポリメラーゼを用いているが、この酵素の起源については90～95℃の温度で活性を保持していれば、どの生物種由来でもよい。熱変性の温度は90～95℃、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング操作の温度は37～65℃、重合反応は50～75℃で、これを1サイクルとしたPCRを25から40サイクル行つて増幅させる。

【0013】検出はPCRを終えた反応液をそのままアガロースゲル等を用いた電気泳動にかけることで、増幅されたヌクレオチド断片の存在、およびその長さを確認できる。その結果から検体中にプライマーが認識すべき配列を持ったヌクレオチドが存在しているかどうか判定することができる。この判定は、そのまゝペロ毒素産生性大腸菌または大腸菌O157の有無を判定するものとなる。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、その他の電気泳動法やクロマトグラフィーも有効である。また、上記増幅されたヌクレオチド断片に相補的なヌクレオチドをプローブとして機能させ、膜上、あるいはその他支持体上において増幅されたヌクレオチド断片を選択的に検出してもよい。

【0014】

【実施例】試験菌株

本発明の性能を評価するために以下の性状を持った腸管\*

菌株番号1: O157, ペロ毒素1型産生, ペロ毒素2型産生

菌株番号2: O157, ペロ毒素1型産生、

菌株番号3: O157, ペロ毒素2型産生

菌株番号4: O157, ペロ毒素非産生

菌株番号5: O111, ペロ毒素1型産生、ペロ毒素2型産生

菌株番号6: O26, ペロ毒素1型産生

菌株番号7: O139, ペロ毒素2型産生

菌株番号8: O1, ペロ毒素非産生

これら菌株の性状は抗血清による通常の免疫学的手法に基づき決定されたものである。

【0015】試料調整

各菌株をTSB培地で終夜培養した後、培養液を95℃、5分間の加熱処理し、菌抽出液を得た。

【0016】プライマー

配列番号1～6に示した各配列を選び、それらと同じ配列のオリゴヌクレオチドを化学合成した。化学合成は、β-シアノエチルフォスホアミダイト法により行った。合成したオリゴヌクレオチドの精製は、C18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで行った。各プライマーは配列番号1及び2のオリゴヌクレオチドについては0.8 pmol/L、配列番号3、4、5、6のオリゴヌクレオチドについては3.2 pmol/Lの濃度で混合し蒸留水に溶解させ、プライマー混合液とした。

【0017】陽性コントロール用鋳型DNA

本実施例では試料溶液等からの反応阻害物質による反応不良の結果、偽陰性となるのを防ぐため、陽性コントロール用鋳型DNAを反応液に添加した。陽性コントロール用鋳型DNAはCompetitive DNA Construction Kit(宝酒造製)を用い、配列番号1および2のプライマーにより641塩基の増幅産物が生成するように1 μL当たり5分子の濃度の水溶液として調製した。なお、陽性コントロール用鋳型DNAは偽陰性の恐れがない場合は添加しなくともよい。

【0018】PCR

前記試料液5 μLを用い、それに滅菌蒸留水10.75 μL、5×反応用緩衝液(Ampdirect: 島津製作所製)10 μL、dNTP溶液4 μL、プライマー混合液10 μL、陽性コントロール用鋳型DNA10 μLおよび耐熱性DNAポリメラーゼ0.25 μLを加えて、全量50 μLの反応液を調製した。この反応液の入った容器にミネラルオイル(SIGMA社製)を20 μL加え、反応液上に重層した。耐熱性DNAポリメラーゼは宝酒造製のTaq DNAポリメラーゼを使用した。反応条件は、次のとおりである。

熱変性: 94℃、1分

アニーリング: 55℃、1分

\*出血性大腸菌6株及び陰性対照としての非病原性大腸菌1株を用いた。

重合反応: 72℃、1分

熱変性からアニーリングを経て、重合反応に至る過程を1サイクルとし、これを35サイクル(総所要時間約3時間)行った。これらの操作は、DNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer Cetus社製)に上記反応条件をプログラムして行った。

【0019】検出

反応液から増幅されたヌクレオチド断片を検出するため、アガロースゲル電気泳動を以下のように行った。アガロースゲルはゲル濃度2.5% (W/V)とし、臭化エチジウム(0.5 μg/mL)を含むものを用いた。泳動の条件は5 V/cm、60分で行った。操作方法ならびに他の条件は、Maniatis等著 Molecular Cloning 第2版(1989)に記載されている技法で行った。反応液の他に分子量マーカーの泳動も同時に行い、相対移動度の比較によりヌクレオチド断片の長さを算出した。

【0020】結果

O157糖合成遺伝子は配列番号1及び配列番号2のプライマーセットにより検出され、457塩基対の当該遺伝子由来の増幅産物が生成すると予想される。また、ペロ毒素1型遺伝子は、配列番号3および配列番号4のプライマーセットにより同様に349塩基対の増幅産物が生成すると予想される。さらに、ペロ毒素2型遺伝子及びその変異型遺伝子は、配列番号5および配列番号6のプライマーセットにより同様に112塩基対の増幅産物が生成すると予想される。これらの予想された増幅産物のヌクレオチド長と実際に増幅されたヌクレオチド長が一致した場合、これらプライマーは、標的としている遺伝子領域を正しく増幅していると判断した。

【0021】検出結果をアガロースゲル電気泳動のゲル写真図として図1に示す。図1中Mは分子量マーカーφX174/HincII、各レーンの番号は菌株番号に対応する。図1より各菌株の性状に合わせて予想される分子量の増幅産物が確認されていることがわかる。従って、本発明は、試験菌株の性状に合わせて標的遺伝子を正しく検出していることが示された。なお、陽性コントロール用鋳型DNA由来の641塩基の増幅産物は標的遺伝子が存在する場合は検出されないか、又は検出されても当該産物の量が少なくなる場合がある。ただし、標的遺伝子を

全く保有しない菌株番号 8 の菌株では陽性コントロール用鋳型 DNA 由来の 641 塩基の増幅産物のみが明確に確認できた (図中、レーン 8)。

【0022】

【発明の効果】本発明では、O157 融合領域遺伝子、ペロ毒素 1 型遺伝子、および同 2 型遺伝子を個別にかつ同時に検出することにより腸管出血性大腸菌症の起原因菌を簡便かつ迅速に同定することができる。以上により腸管出血性大腸菌症の治療及び感染予防に有効な手法を提供することになる。

【配列表】

<110>shinadzu corp.

<120>Method for detecting enteric hemorrhagic E. coli

<130>K0990761

<160> 6

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

gtatttgagacatggagc

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

actaatgacagctgttc

<210> 3

\* <211> 19

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

caacactggatgatctcag

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Escherichia coli

10 <400> 4

ccccctcaactgaata

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

atcagtcgtcactcactggt

<210> 6

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli

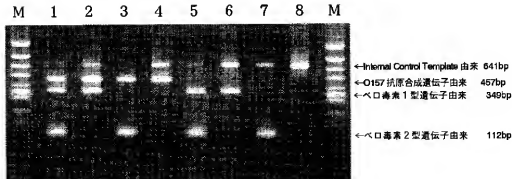
<400> 6

ctgctgtcacagtgacaaa

【図面の簡単な説明】

【図 1】代表的な腸管出血性大腸菌から試料調製し、本発明のプライマーを用いてペロ毒素 1 型遺伝子、ペロ毒素 2 型遺伝子及び O157 抗原合成遺伝子を同時に増幅させ、その増幅断片をアガロースゲル電気泳動により検出した図。

【図 1】



各レーンの番号は菌株番号に対応

M は 分子量マーカー  $\phi$  X174/Hinc II